

Е. В. Чихиржина¹, И. А. Белая², Ю. Г. Баранова^{1,2}, А. М. Поляничко^{1,2}

ВЛИЯНИЕ ДИХЛОРОДИАММИНПЛАТИНЫ(II) НА ДИМЕРИЗАЦИЮ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В РАСТВОРЕ*

¹ Институт цитологии Российской академии наук,
Российская Федерация, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

² Санкт-Петербургский государственный университет,
Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

С помощью методов инфракрасной спектроскопии и электрофоретического анализа исследованы комплексы *цис*- и *транс*-изомеров дихлородиамминплатины(II) (ДДП) с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Показано, что в условиях избытка ДДП в растворе при концентрациях БСА, близких к физиологической, наблюдается образование межмолекулярных белковых комплексов. Анализ инфракрасных спектров позволяет сделать вывод, что при связывании БСА с ДДП происходит изменение вторичной структуры белка: количество α -спиральных участков уменьшается с 65 до 55% в комплексах *цис*-ДДП/БСА и до 48% в случае *транс*-ДДП, количество β -структур увеличивается с 15–20 до 20–30% для комплексов БСА с *цис*-ДДП и до 35–40% для *транс*-ДДП/БСА. Основываясь на полученных данных, можно предположить, что связывание с ДДП способствует изменению вторичной структуры БСА, стимулирующему димеризацию белка в растворе. Библиогр. 47 назв. Ил. 3. Табл. 1.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, дихлородиамминплатина(II), инфракрасная спектроскопия.

Для цитирования: Чихиржина Е. В., Белая И. А., Баранова Ю. Г., Поляничко А. М. Влияние дихлородиамминплатины(II) на димеризацию бычьего сывороточного альбумина в растворе // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4 (62). Вып. 1. С. 46–58.

E. V. Chikhirzhina¹, I. A. Belaya², Yu. G. Baranova^{1,2}, A. M. Polyanychko^{1,2}

THE INFLUENCE OF DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) ON THE FORMATION OF PROTEIN DIMERS IN THE SOLUTIONS OF BOVINE SERUM ALBUMIN

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,
4, Tikhoretskiy ave., St. Petersburg, 194064, Russian Federation

² St. Petersburg State University,
7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Complexes of *cis*- and *trans*-isomers of diamminedichloroplatinum(II) (DDP) with bovine serum albumin (BSA) were studied using electrophoretic analysis and FTIR spectroscopy. We have demonstrated that intermolecular protein complexes were formed in solutions containing excessive amount of platinum and BSA in concentrations close to the physiological one. Analysis of the IR spectra revealed that the interaction of BSA with DDP is accompanied by decreasing α -helical content of the BSA from 65 to 55% in the complexes with *cis*-DDP and to 48% in the case of *trans*-DDP; while the amount of β -structures in the protein increases from 15–20 to 20–30% in the complexes with *cis*-DDP and to 35–40% in the complexes with *trans*-DDP. Based on the

* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э. В. Фрисман, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-06993, 15-08-06876).

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2017

data obtained we suggest, that the binding of DDP induces the changes in the protein secondary structure, which stimulates dimerization of the BSA in solution. Refs 47. Figs 3. Tables 1.

Keywords: BSA, DDP, FTIR spectroscopy.

For citation: Chikhirzina E. V., Belaya I. A., Baranova Yu. G., Polyanichko A. M. Effect of diamminedichloroplatinum(II) on dimerization of bovine serum albumin in solution. *Vestnik SPbSU. Physics and Chemistry*. 2017, vol. 4 (62), issue 1, pp. 46–58.

Введение. Сегодня в медицинской практике применяется ряд противоопухолевых препаратов, созданных на основе координационных соединений платины(II). Среди них наиболее известным и распространённым является цисплатин (*цис*-дихлородиаммин-платина(II), *цис*-ДДП). Связываясь с ядерной ДНК, соединения платины(II) образуют на ДНК различные структурные аддукты и индуцируют апоптоз опухолевой клетки [1–5]. Биологическая активность платиновых соединений также зависит и от их способности вступать в реакцию с другими компонентами клетки, в том числе с белками [6, 7], которые в настоящее время рассматриваются в качестве потенциальных мишеней для цисплатина и других цитостатических препаратов [8]. Цисплатин, как и многие другие платиновые цитостатики, попадает в организм через кровь и в течение дня практически весь препарат связывается с белками плазмы крови [9]. Более половины всех белков плазмы крови составляют сывороточные альбумины [10]. Эти белки связывают различные физиологические лиганды, в том числе ионы металлов, аминокислоты, лекарственные препараты [11]. Взаимодействуя с цисплатином, альбумины существенно влияют на метаболизм и эффективность препарата [11]. Согласно литературным данным, сывороточные альбумины имеют несколько сайтов связывания с препаратами платины [11–16]. С некоторыми сайтами наблюдается относительно слабое связывание. При этом формируются аддукты, которые легко диссоциируют в растворе. В других местах образуются настолько сильные связи, что дальнейшее высвобождение лекарственного препарата из молекулы альбумина становится невозможным без деградации самого белка. Кроме того, показано, что взаимодействие сывороточного альбумина с ДДП приводит к значительным изменениям вторичной структуры белка. Однако молекулярные механизмы этого процесса до сих пор активно обсуждаются [11, 13, 16].

Бычий сывороточный альбумин (БСА) широко используется в экспериментах *in vitro* и является самым дешевым структурным аналогом для других альбуминов, включая сывороточный альбумин человека [17, 18]. Ранее несколькими авторами было показано, что сывороточные альбумины способны образовывать в растворе димеры и более крупные олигомеры [14, 19–23], однако влияние димерных форм БСА на функционирование белка остается мало изученным. В нашей работе мы исследовали димеризацию БСА в присутствии *цис*- и *транс*-изомеров ДДП с помощью методов инфракрасной спектроскопии и электрофоретического анализа.

Материалы и методы.

Подготовка препаратов. Использовали бычий сывороточный альбумин фирмы «Реахим» (Россия). Растворы белка перед использованием центрифугировали при 10 000*g* в течение 10 мин. Качество и чистоту белка анализировали электрофоретически как было описано ранее [24]. Концентрацию белка в растворе определяли спектрофотометрически [25]. Мономерную фракцию БСА получали методом хроматографии исключённого объёма с использованием хроматографической системы Akta Start (General Electric, USA), оснащённой колонкой HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (General Electric, USA) и системой УФ-детекции на 280 нм. Скорость потока и давление в системе поддерживали на уровне 0,5 мл/мин и 0,15 МПа соответственно. На колонку

наносили 5 мл образца (концентрация БСА 5 мг/мл) в растворе 50мМ ацетатного буфера (pH = 4,0). Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения UniHorn, которое поставляется вместе с хроматографической системой. Собранные белковые фракции анализировали в полиакриламидном геле (ПААГ). Стабильность мономеров БСА в растворе проверяли с помощью анализа в ПААГ и методом динамического рассеяния света (Photocor-Complex, Россия).

Все водные растворы приготовлены с использованием ультрачистой воды (Direct-Q System, Millipore, США). Образцы для ИК-спектроскопии были подвергнуты изотопному замещению с использованием тяжелой воды (99,9% D₂O, Sigma, США), как было описано ранее [26–28].

В работе использовали *цис*- и *транс*-изомеры дихлородиамминплатины(II) (ДДП) производства фирмы Alfa-Aesar (США). Концентрированные исходные растворы ДДП содержали 100мМ NaCl и хранились в темноте при комнатной температуре. Концентрацию ДДП в растворах определяли спектрофотометрически [29, 30]. Комплексы БСА/ДДП готовили путём непосредственного смешивания соответствующих количеств растворов БСА и ДДП, с последующей инкубацией при +37°C в течение 48 ч. Полученные растворы содержали ДДП и белок в молярных соотношениях [Pt]/[БСА] (*r*) от 1 : 1 до 150 : 1. Конечная концентрация белка в растворах не превышала 0,4 г/л.

Электрофоретический анализ. Полученные комплексы анализировали в системе денатурирующего и нативного гель-электрофореза [24, 31]. Гели окрашивали при помощи Coomassie Brilliant Blue R-250 по стандартной методике и визуализировали при помощи системы «Gel-Imager» («Хеликон», Россия).

Инфракрасная спектроскопия. Инфракрасные спектры регистрировали на ИК-фурье-спектрометрах Nicolet 8700 (Thermo Scientific, США) и Tensor-27 (Bruker, Германия), оснащённых МСТ-детекторами. Измерения проводили в разборной кювете с окнами из CaF₂. Спектры регистрировали двумя последовательными сериями по 300 накоплений с разрешением 2 см⁻¹ в диапазоне 4000–900 см⁻¹. Обработку спектров проводили с использованием программного обеспечения OMNIC (Thermo Scientific) и Opus (Bruker), которые поставляются с приборами. Коррекция базовой линии, сглаживание и разложение спектральных полос были выполнены с использованием программного обеспечения Origin 9.0 [22, 23].

Результаты и обсуждение. Качественный анализ комплексов ДДП/БСА проводили с помощью электрофоретического разделения в полиакриламидном геле. Этот метод позволяет оценить чистоту и целостность белка, в том числе количество и относительное соотношение белковых фракций, содержащихся в пробе. Известно, что в водном растворе БСА находится в виде мономеров, димеров и более крупных олигомерных фракций, которые отчётливо видны при электрофоретическом разделении. На рис. 1, *а* хорошо различимы перечисленные фракции БСА (дорожка 1). Возможные механизмы образования димеров/олигомеров в растворах БСА в последнее время активно обсуждаются в литературе [19, 20, 22, 32–34].

Для того чтобы получить очищенные мономерные фракции БСА мы провели дополнительную очистку белка с использованием гель-фильтрационной хроматографии. Образцы белка анализировали электрофоретически в денатурирующих и в нативных условиях, а также методом динамического рассеяния света (данные не представлены). Оба метода показали стабильное отсутствие димеров в образцах.

Чтобы уменьшить концентрационные эффекты, которые ранее были описаны для растворов человеческого сывороточного альбумина при физиологических концентрациях [21, 35, 36], комплексы ДДП с мономерами БСА готовили в концен-

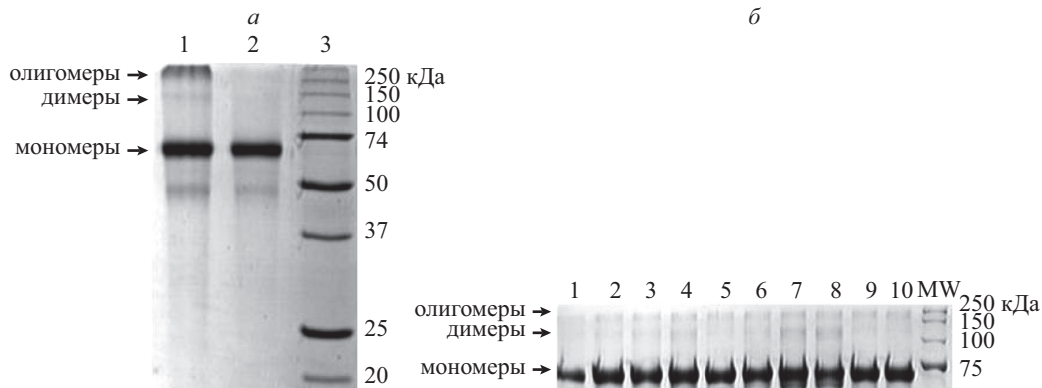


Рис. 1. Электрофореграмма БСА до и после очистки белка (а). Дорожки: 1 — БСА исходный; 2 — мономеры; 3 — маркер Precision Plus (Bio-Rad, USA);

Электрофореграмма комплексов мономеров БСА с *цис*-ДДП и *транс*-ДДП в денатурирующих условиях в зависимости от молярного соотношения $[Pt]/[BCA]$ (б): $r = 10$ (дорожка 1 — *цис*-ДДП/БСА, 5 — *транс*-ДДП/БСА); $r = 50$ (дорожка 2 — *цис*-ДДП/БСА, 6 — *транс*-ДДП/БСА); $r = 100$ (дорожка 3 — *цис*-ДДП/БСА, 7 — *транс*-ДДП/БСА); $r = 150$ (дорожка 4 — *цис*-ДДП/БСА, 8 — *транс*-ДДП/БСА). На дорожке 9 представлены мономеры БСА после инкубации при 37°C. На дорожке 10 БСА после хранения при 4°C в течение времени, необходимого для образования комплекса ДДП/БСА. MW — маркер молекулярного веса — Precision Plus Protein Unstained (Bio-Rad, USA).

Концентрация БСА в комплексах составляла 0,2 мг/мл

трации БСА не выше 0,4 г/л, как уже упоминалось. Для увеличения вероятности комплексообразования ДДП/БСА в этих условиях мы использовали избыток ДДП (r от 1 : 1 до 150 : 1). Чтобы проверить влияние процедуры подготовки образца на стабильность белка, готовили два контрольных образца нативного БСА, один из которых хранили при +4°C, в то время как другой инкубировали при +37°C вместе с остальными пробами. Результаты разделения комплексов в ПААГ в денатурирующих условиях, показаны на рис. 1, б. Дорожки 1 и 5, содержащие комплексы с $r = 10$ для *цис*- и *транс*-ДДП соответственно, демонстрируют присутствие в пробах димеров и более крупных олигомеров. Количество димеров, обнаруженных в 1 и 5 образцах, сопоставимо с контрольным образцом, инкубированным при +37°C (дорожка 9), что указывает на небольшое взаимодействие молекул белка друг с другом при повышенных температурах.

Увеличение концентрации ДДП в комплексе *цис*-ДДП/БСА приводит к постепенному росту количества димеров (полосы 2–4). Более четко это проявляется в случае *транс*-ДДП/БСА (дорожки 6–8). Наблюдаемый процесс димеризации БСА можно объяснить возникновением межмолекулярных сшивок в молекулах белка, содержащих аддукты ДДП. Поскольку основными мишенями для координационных соединений платины в белках являются атомы серы метионина и цистеина [6, 12, 13], вероятнее всего, димеризация БСА проходит за счёт цистеина в 34 положении и/или за счёт одного из четырех остатков метионина. Тем не менее стоит отметить, что при более высоких концентрациях *транс*-ДДП на электрофореграмме появляется новая узкая полоса ниже мономерной фракции (дорожки 7 и 8). Поскольку никаких признаков деградации белка нами не выявлено ни в контрольных пробах, ни в комплексах *цис*-ДДП/БСА, мы полагаем, что это может быть признаком появления внутримолекулярных сшивок,

в результате чего происходит частичная компактизация молекулы БСА. Геометрия *транс*-изомера ДДП позволяет предположить, что такой тип сшивок формируется легче именно для *транс*-изомера. Тем не менее не ясно, вовлечены ли в эти взаимодействия другие остатки цистеинов, кроме Cys34, и/или боковые цепи гистидина, что также возможно при высоких концентрациях ДДП [11–13, 15].

Электрофорез белков в денатурирующих условиях позволяет получить информацию только о молекулярной массе определённых частиц в образце, исключая при этом возможность анализа конформационных изменений молекул в нативном состоянии. Кроме того, можно предположить, что количество димеров, обнаруженное при таком разделении, будет значительно меньше, чем их фактическое число в растворе. Это связано с тем, что процедура пробоподготовки для денатурирующего электрофореза может привести к разрушению межмолекулярных белковых комплексов, за исключением самых стабильных ковалентно связанных. Чтобы проверить это предположение, мы проанализировали комплексы в нативных условиях (рис. 2). В этой системе также, как и в предыдущем случае, количество димеров, постепенно возрастает с увеличением r , а соответствующие им полосы остаются очень слабыми. Тем не менее в нативных условиях мономерные фракции демонстрируют очень высокую неоднородность, что возможно в результате конформационной гетерогенности белка и/или разного числа молекул лекарственного препарата, связанного с БСА. Для дальнейшего исследования структурной организации БСА в комплексах мы применили метод ИК-спектроскопии.

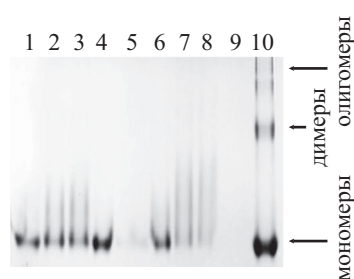


Рис. 2. Электрофореграмма комплексов мономеров БСА с *цис*-ДДП и *транс*-ДДП в нативных условиях в зависимости от молярного соотношения $[Pt]/[BSA]$: $r = 10$ (дорожка 1 – *цис*-ДДП/БСА, 6 – *транс*-ДДП/БСА); $r = 100$ (дорожка 2 – *цис*-ДДП/БСА, 7 – *транс*-ДДП/БСА); $r = 150$ (дорожка 3 – *цис*-ДДП/БСА, 8 – *транс*-ДДП/БСА). На дорожке 4 представлены мономеры БСА после инкубации при 37°C в течение 48 ч. На дорожке 10 БСА, не очищенный от олигомеров

Анализ вторичной структуры БСА в присутствии ДДП. Несмотря на то, что взаимодействие цисплатина с альбуминами изучалось в течение многих лет [11–14, 16], большинство этих исследований было сосредоточено на определении участков связывания лекарственного препарата, а также на изучении механизмов реакции ДДП с белками. Мы применили ИК-спектроскопию для анализа влияния *цис*- и *транс*-ДДП на межмолекулярные взаимодействия БСА в растворе.

Физико-химические свойства альбуминов в растворе в значительной степени зависят от эффектов макромолекулярного краудинга [35, 36]. В большинстве случаев спектроскопические методы, такие как УФ круговой дихроизм, которые могут предоставить информацию о вторичной структуре молекул, требуют относительно низкой концентрации белка (как правило, 1 г/л и ниже) [37, 38]. Как следствие, применимость этих методов весьма ограничена в исследованиях растворов сывороточных альбуминов при физиологических концентрациях, составляющих порядка 40–60 г/л. Инфракрасная спектроскопия, напротив, позволяет работать с высококонцентрированными растворами белков, что даёт возможность получить более полную информацию о структурных особенностях белка [26, 39–41].

Для исследования вторичной структуры БСА в комплексах с ДДП мы получили ИК-спектры белка и его комплексов в растворах D₂O с последующим анализом полосы Амид I'. Амид I' представляет собой композиционную полосу, описывающую главным образом колебания C=O группы полипептидной цепи, чувствительные ко вторичной структуре белка [42–46]. Для анализа колебаний, формирующих полосу Амид I' мы провели разложение спектральных полос (рис. 3) методом анализа второй производной, как это было описано ранее [23]. Такое разложение позволило нам определить колебания, дающие вклад в полосу Амид I', и соотнести их с конкретным типом вторичной структуры белка. Результаты анализа приведены в таблице и показывают, что приблизительно 65% полипептидной цепи БСА принимают α -спиральную конформацию и не более 3–5% аминокислотных остатков принимают участие в формировании межмолекулярных β -структур, что проявляется в спектральной полосе около 1620 см⁻¹.

**Основные характеристики колебаний полосы Амид I' в D₂O
на основании ранее опубликованных данных [42–47] и оценка
вторичной структуры БСА в комплексе с ДДП**

Максимум поглощения, см ⁻¹	Тип вторичной структуры	Доля вторичной структуры, %		
		БСА	<i>цис</i> -ДДП/БСА	<i>транс</i> -ДДП/БСА
1670–1690	β -поворот	8–10	8–10	9–11
1650–1660	α -спираль	63–68	52–57	45–50
1640–1650	неупорядоченный клубок	5–7	8–14	5–7
1615–1640	β -листы	15–20	20–30	35–40

Присутствие *цис*- и *транс*-ДДП в растворе приводит к заметному изменению полосы Амид I', что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными [13]. Доля α -спиральных участков в молекуле БСА, соответствующая колебаниям полосы 1654 см⁻¹, уменьшается от \approx 65% до \approx 55 и 48% в комплексах с *цис*- и *транс*-ДДП соответственно. Снижение количества участков с α -спиральной конформацией сопровождается увеличением количества β -структур, наблюдаемых в спектральном диапазоне 1615–1640 см⁻¹, от 15–20% в нативном белке до 20–30% в его комплексах с *цис*-ДДП и до 35–40% в комплексах *транс*-ДДП/БСА. Следует отметить, что вклад спектральных полос с максимумом в окрестности 1620 см⁻¹ возрастает до 12–17% в комплексах *цис*-ДДП/БСА и до 25–27% в *транс*-ДДП/БСА. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с усилением межмолекулярных взаимодействий в растворе, что объясняет гетерогенность комплексов ДДП/БСА в условиях нативного электрофореза. Мы полагаем, что изменения во вторичной структуре белка, индуцированные связыванием с ДДП, облегчают/стабилизируют взаимодействия между молекулами БСА по сравнению с молекулами белка, обладающими неизменной нативной структурой [22]. Столь сильные структурные изменения позволяют предположить, что значительная часть белковых молекул (если не большинство из них) участвуют в межмолекулярных взаимодействиях.

Такое предположение подтверждается данными, полученными в более ранних работах при хроматографическом анализе комплексов ДДП с сывороточным альбумином человека (ЧСА) [14]. Эти эксперименты показали, что в условиях падающего хроматографического разделения около 20% белка в составе комплексов *цис*-ДДП/ЧСА и около 80% в случае *транс*-ДДП/ЧСА находятся в растворе в виде димеров.

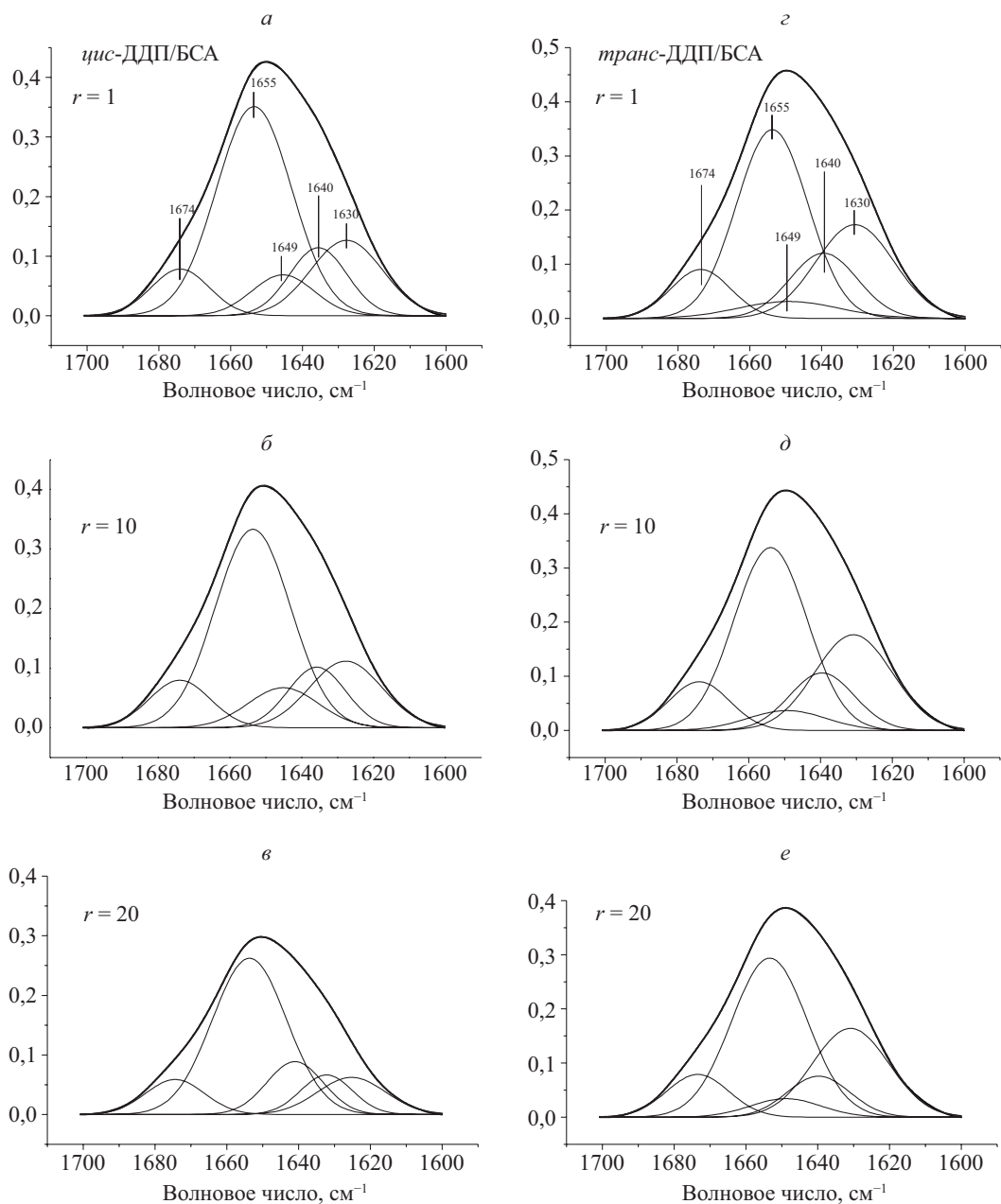


Рис. 3. Разложение полосы Амид Г' для комплексов *цис*-ДДП/БСА (а-в) и *транс*-ДДП/БСА (з-е) в D₂O при различных молярных соотношениях [Pt]/[БСА] (*r*): концентрация БСА в пробах составляла 25 мг/мл, pH = 7,4

На основании полученных нами результатов мы считаем, что подавляющее большинство наблюдаемых димеров стабилизируются слабыми белок-белковыми взаимодействиями, индуцированными связыванием ДДП, в то время как стабильных ковалентно сшитых комплексов не так много. С этой точки зрения, незначительное

количество димеров, обнаруженных при электрофоретическом разделении, обусловлено тем, что слабо связанные между собой комплексы при миграции в геле относительно легко диссоциируют.

В БСА очень мало функциональных групп (главным образом, метионины и цистеины), которые способны образовывать сильные координационные связи с ДДП. Ранее было показано [6, 11, 12, 15], что ДДП легко связывает атомы серы (в метионине и Cys34) с образованием монофункциональных платиновых аддуктов в сывороточных альбуминах. Однако не так легко сформировать бифункциональные аддукты, т. е. межмолекулярные сшивки между отдельными молекулами белка. Чтобы пояснить это, мы должны рассмотреть несколько факторов, влияющих на формирование межмолекулярных сшивок. Первый из них — это доступность боковых цепей Met/Cys для образования межмолекулярной сшивки. Хотя метионин и Cys34 в нативном БСА доступны для связывания с ионами платины, все они расположены в гидрофобных полостях достаточно глубоких, чтобы в них полностью уместилась (скрылась) молекула ДДП (PDB 4F5S). Таким образом, чтобы монофункциональные платиновые аддукты стали доступными для межмолекулярных взаимодействий, необходимо существенно нарушить локальную структуру белка. Кроме того, в соответствии с данными ЯМР и масс-спектрометрии [12, 14], в состоянии, когда молекула ДДП связана с остатками метионина, вторая стадия акватации (активации второго лиганда) протекает крайне медленно (если вообще происходит), что делает маловероятным возможность образования межмолекулярных сшивок.

Ещё одним фактором, ограничивающим формирование сшивок, является необходимость наличия второго свободного атома серы в случае избытка ДДП в среде. Так как первый этап гидратации ДДП идет гораздо быстрее, чем второй, то к тому времени, когда происходит замещение второго хлорид-иона на молекулу воды большинство лигандов серы уже участвуют во взаимодействии с другими молекулами ДДП. Следовательно, вероятность межмолекулярного взаимодействия посредством образования второй координационной связи относительно низкая по сравнению с вероятностью слабых взаимодействий молекул БСА. Исходя из того, что концентрация БСА в образцах для ИК-спектров на два порядка выше, чем для электрофоретического анализа, вероятность межмолекулярных контактов в этих пробах также значительно выше. Таким образом, мы полагаем, что белок-белковые взаимодействия, индуцированные присутствием ДДП, являются обратимыми, и именно они приводят к образованию большого числа димеров в комплексах ДДП/БСА.

Заключение. В своей работе мы показали, что в присутствии дихлородиамминплатины(II) в растворах БСА образуются относительно непрочные межмолекулярные комплексы. По всей видимости, в растворе БСА ДДП индуцирует формирование димеров не столько путём формирования прямых межмолекулярных сшивок, сколько за счёт влияния на этот процесс взаимодействий между молекулами самого белка. На основании полученных данных мы можем предположить, что в системе ДДП/БСА происходит изменение вторичной структуры белка, индуцированное его связыванием с ДДП. Хотя оба изомера ДДП способствуют образованию димеров БСА, наблюдаемый эффект в присутствии *транс*-ДДП значительно сильнее по сравнению с *цис*-изомером. Полученные результаты показывают, что при обсуждении механизмов функционирования сывороточных альбуминов важно учитывать наличие равновесных белковых комплексов.

Часть исследований проведена в ресурсных центрах «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Центр диагностики функциональных материалов в медицине, фармакологии и наноэлектронике» Санкт-Петербургского государственного университета.

Литература

1. Wang D., Lippard J. Cellular processing of platinum anticancer drugs // *Nature Rev.* 2005. Vol. 4. P. 307–320.
2. Todd R. C., Lippard S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds // *Metalomics*. 2009. Vol. 1. P. 280–291.
3. Murray V. Nucleosomes and cisplatin // *Chem. Biol.* 2010. Vol. 17. P. 1271–1272.
4. Oberoi H. S., Nukolova N. V., Kabanov A. V., Bronich T. K. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65. P. 1667–1685.
5. Johnstone T. C., Wilson J. J., Lippard S. J. Monofunctional and higher-valent platinum anticancer agents // *Inorg. Chem.* 2013. Vol. 52. P. 12234–12249.
6. Reedijk J. Why does Cisplatin reach guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell? // *Chem. Rev.* 1999. Vol. 99. P. 2499–2510.
7. Shirazi F., Wong P., Goel R. Interaction of cisplatin with cellular macromolecules: a fourier transform infrared spectroscopy study // *Iranian J. Pharmac. Res.* 2003. Vol. 2, N 1. P. 11–15.
8. Brujininx P. C. A., Sadler P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity // *Curr. Opp. Boil. Chem.* 2008. Vol. 12. P. 197–206.
9. Gullo J. J., Litterst C. L., Maguire P. J., Sikic B. I., Hoth D. F., Woolley P. V. Pharmacokinetics and protein binding of *cis*-dichlorodiammine platinum(II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion // *Cancer Chemother. Pharm.* 1980. Vol. 5. P. 21–26.
10. Peters T. Serum albumine // *Adv. Protein. Chem.* 1985. Vol. 37. P. 161–245.
11. Timerbaev A. R., Hartinger C. G., Aleksenko S. S., Keppler B. K. Interactions of antitumor metallo-drugs with Serum Proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106. P. 2224–2248.
12. Ivanov A. I., Christodoulou J., Parkinson J. A., Barnham K. J., Tucker A., Woodrow J., Sadler P. J. Cisplatin binding sites on human albumin // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 14721–14730.
13. Neault J. F., Tajmir-Riahi H. A. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure // *Biochem. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1384. P. 153–159.
14. Trynda-Lemiesz L., Kozłowski H., Keppler B. K. Effect of *cis*-, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) and DBP on human serum albumin // *J. Inorg. Biochem.* 1999. Vol. 77. P. 141–146.
15. Peleg-Shulman T., Najajreh Y., Gibson D. Interactions of cisplatin and transplatin with proteins: Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles // *J. Inorg. Biochem.* 2002. Vol. 91. P. 306–311.
16. Krause-Heuer A. M., Price W. S., Aldrich-Wright J. R. Spectroscopic investigations on the interactions of potent platinum(II) anticancer agents with bovine serum albumin // *J. Chem. Biol.* 2012. Vol. 5, N 3. P. 105–113.
17. Carter D. C., Ho J. X. Structure of serum albumin // *Adv. Protein Chem.* 1994. Vol. 45. P. 153–203.
18. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin // *Acta Crystallogr. (D)*. 2012. Vol. 68. P. 1278–1289.
19. Barbosa L. R. S., Ortore M. G., Spinozzi F., Mariani P., Bernstorff S., Itri R. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study // *Biophys. J.* 2010. Vol. 98. P. 147–157.
20. Stirpe A., Pantusa M., Rizzuti B., Sportelli L., Bartucci R., Guzzi R. Early stage aggregation of human serum albumin in the presence of metal ions // *Inter. J. Biol. Macromol.* 2011. Vol. 49. P. 337–342.
21. Bhattacharya A., Prajapati R., Chatterjee S., Mukherjee T. K. Concentration-dependent reversible self-oligomerization of serum albumins through intermolecular β -sheet formation // *Langmuir*. 2014. Vol. 30. P. 14894–14904.
22. Поляничко А. М., Михайлов Н. В., Романов Н. М., Баранова Ю. Г., Чихиржина Е. В. Межмолекулярные взаимодействия сывороточного альбумина в растворе // *Цитология*. 2016. Т. 58, № 9. С. 707–713.

23. Поляничко А. М., Романов Н. М., Старкова Т. Ю., Костылева Е. И., Чихиржисина Е. В. Анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 по спектрам инфракрасного поглощения // *Цитология*. 2014. Т. 56, № 4. С. 316–322.
24. Чихиржисина Е. В., Поляничко А. М., Скворцов А. Н., Костылева Е. И., Уссье К., Воробьев В. И. HMG1-домены: заложники обстоятельств // *Молек. Биология*. 2002. Т. 36. С. 525–531.
25. Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein // *Protein Science: A publication of the Protein Society*. 1995. Vol. 4. P. 2411–2423.
26. Polyanchko A. M., Andrushchenko V., Chikhirzhina E., Vorob'ev V., Wieser H. The effect of manganese(II) on DNA structure: Electronic and vibrational circular dichroism studies // *Nucl. Acids Res*. 2004. Vol. 32. P. 989–996.
27. Поляничко А. М., Чихиржисина Е. В., Андрущенко В. В., Костылева Е. И., Wieser H., Воробьев В. И. Влияние ионов Ca^{2+} на компактизацию ДНК в комплексе с негистоновым хромосомным белком HMGB1 // *Молек. Биология*. 2004. Т. 38. С. 701–712.
28. Polyanchko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on the structure of DNA/HMGB1/H1 complexes: Electronic and vibrational circular dichroism studies // *Biopolymers*. 2006. Vol. 83. P. 182–192.
29. Riley C. M., Sternson L. A. Cisplatin // *Analytical profiles of drug substances* / ed. by F. Klaus. Academic Press, 1985. P. 77–105.
30. Tao Z., Xie Y., Goodisman J., Asefa T. Isomer-dependent adsorption and release of *cis*- and *trans*-platin anticancer drugs by mesoporous silica nanoparticles // *Langmuir*. 2010. Vol. 26. P. 8914–8924.
31. Polyanchko A. M., Chikhirzhina E. V., Skvortsov A. N., Kostyleva E. I., Colson P., Houssier C., Vorob'ev V. I. The HMG1 Ta(i)le // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2002. Vol. 19. P. 1053–1062.
32. Vetri V., D'Amico M., Foderà V., Leone M., Ponzoni A., Sberveglieri G., Militello V. Bovine serum albumin protofibril-like aggregates formation: solo but not simple mechanism // *Arch. Biochem. Biophys*. 2011. Vol. 508. P. 13–24.
33. Finn T. E., Nunez A. C., Sunde M., Easterbrook-Smith S. B. Serum albumin prevents protein aggregation and amyloid formation and retains chaperone-like activity in the presence of physiological ligands // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287. P. 21530–21540.
34. Atmeh R. F., Arafa I. M., Al-Khateeb M. Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physicochemical properties // *Jordan J. of Chemistry*. 2007. Vol. 2. P. 169–182.
35. Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. What macromolecular crowding can do to a protein // *Intern. Mol. Sci*. 2014. Vol. 15. P. 23090–23140.
36. Ellis R. J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment // *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2001. Vol. 11. P. 114–119.
37. Polyanchko A. M., Wieser H. Vibrational circular dichroism and its applications to protein studies // *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy* / eds E. Permyakov, V. Uversky. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2007. P. 267–302.
38. Polyanchko A. M., Andrushchenko V. V., Bouř P., Wieser H. Vibrational circular dichroism studies of biological macromolecules and their complexes // *Circular dichroism: theory and spectroscopy*. 2011. P. 67–126.
39. Polyanchko A., Wieser H. Fourier transform infrared/vibrational circular dichroism spectroscopy as an informative tool for the investigation of large supramolecular complexes of biological macromolecules // *Biopolymers*. 2005. Vol. 78. P. 329–339.
40. Чихиржисина Е. В., Поляничко А. М., Костылева Е. И., Воробьев В. И. Структура комплексов ДНК с хромосомным белком HMGB1 и гистоном H1 в присутствии ионов марганца. 1. Спектроскопия кругового дихроизма // *Молек. Биология*. 2011. Т. 45, № 2. С. 356–365.
41. Поляничко А. М., Воробьев В. И., Чихиржисина Е. В. Структура комплексов ДНК с хромосомным белком HMGB1 и гистоном H1 в присутствии ионов марганца. 2. Спектроскопия кругового дихроизма в ИК области // *Молек. Биология*. 2013. Т. 47, № 2. С. 338–346.
42. Susi H., Byler D. M. Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra // *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 1983. Vol. 115. P. 391–397.
43. Surewicz W. K., Mantsch H. H., Chapman D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. P. 389–394.
44. Barth A., Zscherp C. What vibrations tell us about proteins? // *Q. Rev. Biophys*. 2002. Vol. 35. P. 369–430.
45. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics*. 2007. Vol. 1767. P. 1073–1101.
46. Kong J., Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures // *Acta Biochim. Biophys. Sin*. 2007. Vol. 39, N 8. P. 549–559.

47. Murayama K., Tomida M. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy // *Biochemistry*. 2004. Vol. 43. P. 11526–11532.

References

1. Wang D., Lippard J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Rev.*, 2005, vol. 4, pp. 307–320.
2. Todd R. C., Lippard S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 2009, vol. 1, pp. 280–291.
3. Murray V. Nucleosomes and cisplatin. *Chem. Biol.*, 2010, vol. 17, pp. 1271–1272.
4. Oberoi H. S., Nukolova N. V., Kabanov A. V., Bronich T. K. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, vol. 65, pp. 1667–1685.
5. Johnstone T. C., Wilson J. J., Lippard S. J. Monofunctional and higher-valent platinum anticancer agents. *Inorg. Chem.*, 2013, vol. 52, pp. 12234–12249.
6. Reedijk J. Why does Cisplatin reach guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell? *Chem. Rev.*, 1999, vol. 99, pp. 2499–2510.
7. Shirazi F., Wong P., Goel R. Interaction of cisplatin with cellular macromolecules: a fourier transform infrared spectroscopy study. *Iranian J. Pharmac. Res.*, 2003, vol. 2, no 1, pp. 11–15.
8. Bruijninx P. C. A., Sadler P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opp. Boil. Chem.*, 2008, vol. 12, pp. 197–206.
9. Gullo J. J., Litterst C. L., Maguire P. J., Sikic B. I., Hoth D. F., Woolley P. V. Pharmacokinetics and protein binding of *cis*-dichlorodiammine platinum(II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemother. Pharm.*, 1980, vol. 5, pp. 21–26.
10. Peters T. Serum albumine. *Adv. Protein. Chem.*, 1985, vol. 37, pp. 161–245.
11. Timerbaev A. R., Hartinger C. G., Aleksenko S. S., Keppler B. K. Interactions of antitumor metal-lodrugs with Serum Proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem. Rev.*, 2006, vol. 106, pp. 2224–2248.
12. Ivanov A. I., Christodoulou J., Parkinson J. A., Barnham K. J., Tucker A., Woodrow J., Sadler P. J. Cisplatin binding sites on human albumin. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, pp. 14721–14730.
13. Neault J. F., Tajmir-Riahi H. A. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochem. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1384, pp. 153–159.
14. Trynda-Lemiesz L., Kozłowski H., Keppler B. K. Effect of *cis*-, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) and DBP on human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.*, 1999, vol. 77, pp. 141–146.
15. Peleg-Shulman T., Najajreh Y., Gibson D. Interactions of cisplatin and transplatin with proteins: Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles. *J. Inorg. Biochem.*, 2002, vol. 91, pp. 306–311.
16. Krause-Heuer A. M., Price W. S., Aldrich-Wright J. R. Spectroscopic investigations on the interactions of potent platinum(II) anticancer agents with bovine serum albumin. *J. Chem. Biol.*, 2012, vol. 5, no 3, pp. 105–113.
17. Carter D. C., Ho J. X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, 1994, vol. 45, pp. 153–203.
18. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr. (D)*, 2012, vol. 68, pp. 1278–1289.
19. Barbosa L. R. S., Ortore M. G., Spinozzi F., Mariani P., Bernstorff S., Itri R. The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study. *Biophys. J.*, 2010, vol. 98, pp. 147–157.
20. Stirpe A., Pantusa M., Rizzuti B., Sportelli L., Bartucci R., Guzzi R. Early stage aggregation of human serum albumin in the presence of metal ions. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 2011, vol. 49, pp. 337–342.
21. Bhattacharya A., Prajapati R., Chatterjee S., Mukherjee T. K. Concentration-dependent reversible self-oligomerization of serum albumins through intermolecular β -sheet formation. *Langmuir*, 2014, vol. 30, pp. 14894–14904.
22. Polyanichko A. M., Mikhailov N. V., Romanov N. M., Baranova I. G., Chikhirzhina E. V. Mezhamolekuliarnye vzaimodeistviia syvorochnogo al'bmina v rastvore [Intermolecular interactions in the solutions of serum albumin]. *Tsitologiya [Cytology]*, 2016, vol. 58, no 9, pp. 707–713. (In Russian)
23. Polyanichko A. M., Romanov N. M., Starkova T. Y., Kostyleva E. I., Chikhirzhina E. V. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. *Cell and Tissue Biology*, 2014, vol. 8, no 4, pp. 352–358.
24. Chikhirzhina E. V., Polianichko A. M., Skvortsov A. N., Kostyleva E. I., Houssier C., Vorob'ev V. I. HMG1-domeny: zalozhniki obstoiatel'stv [HMG1 domains: the victims of circumstance]. *Molek. Biologiya [Molecular Biology]*, 2002, vol. 36, pp. 525–531. (In Russian)

25. Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A publication of the Protein Society*, 1995, vol. 4, pp. 2411–2423.
26. Polyanichko A. M., Andrushchenko V., Chikhirzhina E., Vorob'ev V., Wieser H. The effect of manganese(II) on DNA structure: Electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucl. Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. 989–996.
27. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Kostyleva E. I., Wieser H., Vorob'ev V. I. Vlianie ionov Ca^{2+} na kompaktizatsiiu DNK v komplekse s negistonovym khromosomnym belkom HMGB1 [The effect of Ca^{2+} ions on DNA compaction in the complex with HMGB1 nonhistone chromosomal protein]. *Molek. Biologiya [Molecular Biology]*, 2004, vol. 38, pp. 701–712. (In Russian)
28. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Andrushchenko V. V., Vorob'ev V. I., Wieser H. The effect of manganese(II) on the structure of DNA/HMGB1/H1 complexes: Electronic and vibrational circular dichroism studies. *Biopolymers*, 2006, vol. 83, pp. 182–192.
29. Riley C. M., Sternson L. A. Cisplatin. *Analytical profiles of drug substances*. Ed. by F. Klaus. Academic Press, 1985, pp. 77–105.
30. Tao Z., Xie Y., Goodisman J., Asefa T. Isomer-dependent adsorption and release of *cis*- and *trans*-platin anticancer drugs by mesoporous silica nanoparticles. *Langmuir*, 2010, vol. 26, pp. 8914–8924.
31. Polyanichko A. M., Chikhirzhina E. V., Skvortsov A. N., Kostyleva E. I., Colson P., Houssier C., Vorob'ev V. I. The HMGB1 Ta(i)le. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2002, vol. 19, pp. 1053–1062.
32. Vetri V., D'Amico M., Foderà V., Leone M., Ponzoni A., Sberveglieri G., Militello V. Bovine serum albumin protofibril-like aggregates formation: solo but not simple mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, vol. 508, pp. 13–24.
33. Finn T. E., Nunez A. C., Sunde M., Easterbrook-Smith S. B. Serum albumin prevents protein aggregation and amyloid formation and retains chaperone-like activity in the presence of physiological ligands. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, pp. 21530–21540.
34. Atmeh R. F., Arafa I. M., Al-Khateeb M. Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties. *Jordan J. of Chemistry*, 2007, vol. 2, pp. 169–182.
35. Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. What macromolecular crowding can do to a protein. *Intern. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, pp. 23090–23140.
36. Ellis R. J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, vol. 11, pp. 114–119.
37. Polyanichko A. M., Wieser H. Vibrational circular dichroism and its applications to protein studies. *Methods in protein structure and stability analysis: vibrational spectroscopy*. Eds E. Permyakov, V. Uversky. New York, Nova Science Publishers, Inc., 2007, pp. 267–302.
38. Polyanichko A. M., Andrushchenko V. V., Bouf P., Wieser H. Vibrational circular dichroism studies of biological macromolecules and their complexes. *Circular dichroism: theory and spectroscopy*, 2011, pp. 67–126.
39. Polyanichko A., Wieser H. Fourier transform infrared/vibrational circular dichroism spectroscopy as an informative tool for the investigation of large supramolecular complexes of biological macromolecules. *Biopolymers*, 2005, vol. 78, pp. 329–339.
40. Chikhirzhina E. V., Polyanichko A. M., Kostyleva E. I., Vorobyev V. I. Struktura kompleksov DNK s khromosomnym belkom HMGB1 i gistonom N1 v pristutstvii ionov margantsai. 1. Spektroskopiiia krugovogo dikhroizma [Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions. I. Circular dichroism spectroscopy]. *Molek. Biologiya [Molecular Biology]*, 2011, vol. 45, no 2, pp. 356–365. (In Russian)
41. Polyanichko A. M., Vorob'ev V. I., Chikhirzhina E. V. Struktura kompleksov DNK s khromosomnym belkom HMGB1 i gistonom N1 v pristutstvii ionov margantsa. 2. Spektroskopiiia krugovogo dikhroizma v IK oblasti [Structure of DNA complexes with chromosomal protein HMGB1 and histone H1 in the presence of manganese ions. II. Vibrational circular dichroism spectroscopy]. *Molek. Biologiya [Molecular Biology]*, 2013, vol. 47, no 2, pp. 338–346. (In Russian)
42. Susi H., Byler D. M. Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, vol. 115, pp. 391–397.
43. Surewicz W. K., Mantsch H. H., Chapman D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, pp. 389–394.
44. Barth A., Zscherp C. What vibrations tell us about proteins? *Q. Rev. Biophys.*, 2002, vol. 35, pp. 369–430.
45. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics*, 2007, vol. 1767, pp. 1073–1101.
46. Kong J., Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2007, vol. 39, no 8, pp. 549–559.

47. Murayama K., Tomida M. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, pp. 11526–11532.

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

Контактная информация

Чихиржина Елена Всеволодовна — кандидат биологических наук, доцент;
e-mail: chikhir@gmail.com

Белая Ирина Александровна — аспирантка; e-mail: belaya.irina.2211@gmail.com

Баранова Юлия Геннадьевна — студентка; e-mail: jul.bar.g@yandex.ru

Поляничко Александр Михайлович — кандидат физико-математических наук, доцент;
e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Chikhirzhina Elena V. — PhD, Senior Researcher; e-mail: chikhir@gmail.com

Belaya Irina A. — post-graduate student; e-mail: belaya.irina.2211@gmail.com

Baranova Yuliia G. — student; e-mail: jul.bar.g@yandex.ru

Polyanichko Alexander M. — PhD, Associate Professor; e-mail: a.polyanichko@spbu.ru